

N 98-2567

0070

文部省科学研究費補助金

重点領域研究平成9年度 研究成果報告書

「免疫病の分子機構とその修復」

平成10年3月

重点領域研究「免疫病の分子機構とその修復」総括班

領域代表者 高津 聖志
(東京大学医科学研究所 教授)

CD40を介するシグナル伝達の分子機構

井上 純一郎 (東京大学医科学研究所・制癌研究部)

1. 研究目的

CD40は、活性化T細胞に存在するCD40リガンド (CD40L) と結合することによりB細胞内にシグナルを伝達する。ヒトにおいてCD40やCD40Lの点突然変異により重度の免疫不全hyper IgM immuno deficiency (HIM)が発症することから、CD40を介するシグナル伝達を解明することは、免疫病の原因解明とその治療法の開発という点で重要である。我々は、自己免疫疾患の発症に深く関わるB細胞アポトーシスの制御機構を中心にCD40シグナルを研究し、前年度までの結果からCD40によるアポトーシスの解除及び細胞増殖には少なくともCD40から二種類のシグナルが必要であるとする"two signalsモデル"を提唱した。一つはG1期に停止した細胞の死を抑制するBcl-XLの発現誘導。いま一つは、細胞周期をまわしてS期に入るためのCdk4&6とp27^{Kip1}の発現維持である。さらにCD40細胞質領域に結合してシグナルを伝達する2種類の新規TRAF蛋白質 (TRAF5, TRAF6)のcDNAクローニングに成功した。本研究計画では、このtwo signalsとTRAF蛋白質を介するシグナルとの関連を明らかにする為に以下の具体的な研究目的を提唱する。

- 1) 抗原受容体シグナル及びCD40シグナルによるCdk4&6, p27^{Kip1}及びBcl-XLの発現制御のメカニズムを明らかにする。
- 2) CD40細胞質領域に変異を加え、機能ドメインを同定し、各ドメインがどのような機構でシグナル伝達を行うのかを解析する。
- 3) 酵母ツーハイブリット法を中心にTRAF5, TRAF6の下流シグナルを伝達する蛋白質を同定する。
- 4) TRAF5, TRAF6の機能を個体レベルで明らかにするため各々のノックアウトマウス及び各々のドミナントネガティブ変異体を発現し

たトランスジェニックマウスを作製する。

2. 研究成果

各目的毎に成果を報告する。

- 1) Bcl-xの場合、mRNAと蛋白質の量変化がほぼ一致するので両シグナルによる制御はmRNAの量的変化で説明できると思われる。ただしbcl-xのプロモーター活性は両シグナルにより顕著に変化しなかった。Cdk4&6及びp27^{Kip1}の場合mRNAの変化とともに蛋白質の安定性に顕著な変化がみられた。即ち、抗原受容体シグナルによりCdk4&6は不安定になりp27^{Kip1}は逆に安定化した。CD40シグナルは各々の安定性を細胞増殖時 (無刺激時) に戻した。
- 2) 昨年度の結果からCD40細胞質領域の220-245と246-270の二つの領域が独立にNFκBを活性化すること及び246-270が抗原受容体シグナルによるアポトーシスの阻止に必須であることを見い出していた。今年度は各々の領域単独のシグナルではアポトーシスを解除できないこと及びTRAF6との結合には220-245がTRAF5との結合には246-270が必要十分であることを明らかにした。従って、各々領域からそれぞれのTRAFを介して質的に異なるシグナルが伝達されると結論できる。さらに解析が遅れている220-245領域の生理機能を明らかにする目的でTRAF6とこの領域との結合に不可欠なアミノ酸を探索した。この領域は246-270に比べてヒトとマウスのCD40間でホモロジーが低いので両者に共通するアミノ酸すべてに変異を加えて解析した。その結果235番目のGluをAlaに置換する (E235A変異体) とTRAF6が全く結合できないことが明らかとなった。同時にE235A変異体はNFκBを活性化できなかった。今後はこの変異体をB細胞に発現させ、NFκB活性化以外のシグナルについて検討し、

220-245領域の生理機能を明らかにする。

3) TRAF5, TRAF6の下流に存在するシグナル伝達因子を解明するため、TRAF5をbait (餌) にした酵母two-hybrid systemによりTRAF5と相互作用する蛋白質を探索した。およそ20種類の候補クローンを得、塩基配列の解析から始めてその相互作用の生物学的意義を明らかにしつつある。その中の一つはプロテアソームの制御サブユニットの一部であった。TNF受容体の下流にプロテアソームが存在することを示唆する報告がいくつかあること、またTRAF5を介するシグナルによりI κ Bがプロテアソームで分解されること等から本クロンの妥当性を検討している。昨年度TRAF2に結合してRelを活性化するカインースとして報告されたNIKと、逆に活性化を抑制するI-TRAFとの相互作用を調べたところTRAF5,6ともにNIK,I-TRAF各々と結合した。NIKからI κ Bカインース(IKK)にシグナル伝達されと考えられていることからTRAF5,6からIKKに続く経路が存在すると考えられる。また昨年度までに明らかにしたI κ Bと結合してI κ BのSer32,Ser36をリン酸化する酵素の精製を進めている。またヒトTRAF5のcDNAをクローニングし、その遺伝子座が1q32.3-q41.1であること、精製したヒトTRAF5とCD40, CD30, lymphotoxin- β 受容体が直接結合しうることを示した。

4) TRAF5, TRAF6ノックアウトマウス及びドミナントネガティブ変異体を発現したトランスジェニックマウスは現在作製中である。

3. 研究発表

1) Aizawa S., Nakano H., Ishida T., Horie R., Nagai M., Yagita H., Okumura K., Inoue J. and Watanabe T. (1997) TRAF5 and TRAF2 are involved in CD30 mediated NF κ B activation. *J. Biol. Chem.* 272: 2042-2045.

2) Nishiyama-Fujimoto A., Ishii S., Matsuda S., Inoue J. and Yamamoto T. (1997) A novel zinc finger proteins Finb is a transcriptional activator and localized in nuclear bodies. *Gene* 195: 267-275.

3) Sowa Y., Shiio Y., Fujita T., Matsumoto T., Okuyama Y., Kato D., Inoue J., Sawada J., Goto M., Watanabe H., Handa H. and Sakai T. (1997) Retinoblastoma binding factor 1 site in the core promoter of the human Rb gene is activated by hGABP/EFTF1. *Cancer Research* 57: 3145-3148.

4) Baba M., Kikuchi Y., Mori S., Kimoto H., Inui S., Sakaguchi N., Inoue J., Yamamoto T., Takemori T., Howard M. and Takatsu K. (1997) Mouse germinal center B cells with the xid mutation retain responsiveness to anti-mouse CD40 antibodies but diminish IL-5 responsiveness. *Int. Immunol.* 9: 1463-1373.

5) Yoshimoto T., Nagase H., Ishida T., Inoue J. and Nariuchi H. (1997) Induction of Interleukin-12 p40 transcript by CD40 ligation via activation of Nuclear Factor- κ B. *Eur. J. Immunol.* 27: 3461-3470.

6) Horie R., Aizawa S., Nagai M., Ito K., Ishida T., Inoue J. and Watanabe T. (1998) A novel domain in the CD30 cytoplasmic tail mediates NF κ B activation. *Int. Immunol.* in press.

7) Mizushima S., Fujita M., Ishida T., Azuma S., Kato K., Hirai M., Otsuka M., Yamamoto T. and Inoue J. (1998) Cloning and characterization of a cDNA encoding the human homolog of tumor necrosis factor receptor-associated factor 5 (TRAF5). *Gene* in press.

8) Suzuki K., Tsuchida J., Yamamoto T. and Inoue J. (1998) Identification and expression of the *Xenopus* homolog of mammalian p100-NF κ B2. *Gene* in press.

9) Kashiwada M., Shirakata Y., Inoue J., Nakano H., Okazaki K., Okumura K., Yamamoto T., Nagaoka H. and Takemori T. (1998) Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) stimulates extracellular signal-regulated kinase (ERK) activity in CD40 signaling along Ras-independent pathway. *J. Exp. Med.* in press.